

Detección del gen de virulencia fimH en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* mediante PCR-RFLP

PCR-RFLP detection of the fimH virulence gene in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*

Gómez-García, A. K.¹, Vega-Castillo, U.¹, Hernández-Sánchez, N. F.¹, Beltrán-López, E.¹, Sosa-Sillas, E. C.¹, Bueno-González, E.¹, Contreras-Méndez, J. A.¹, León-Sicaños, C. R.² y López-Moreno, H. S.^{1*}

¹Laboratorio de Biomedicina Molecular, CA-UAS-264, Posgrado en Ciencias Biomédicas y Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, CP 80010, Sinaloa, México. ²Laboratorio 19 Infectómica y Patogénesis Molecular, CA-UAS-264, Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, CP 80010, Sinaloa, México

RESUMEN

En 2024, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó su lista de patógenos bacterianos prioritarios para la salud pública, en la cual *Klebsiella pneumoniae* fue clasificada en el primer lugar dentro de la categoría de prioridad crítica por su resistencia antimicrobiana. Esta clasificación refleja la creciente detección de cepas resistentes a carbapenémicos, asociadas con tasas de mortalidad intrahospitalaria superiores al 30 %, junto con la presencia de múltiples genes de virulencia codificados tanto en el cromosoma como en plásmidos. En este contexto, nuestro grupo de investigación inició el estudio de diversos genes relacionados con la virulencia y la resistencia a antimicrobianos. El objetivo del presente estudio fue detectar el gen que codifica la adhesina fimH, componente de la fimbria tipo 1 e implicado en la formación de biopelículas, en aislados clínicos de *K. pneumoniae*. Se analizaron diez aislados clínicos (Kp1–Kp10) y la cepa de referencia ATCC 13883, esta última incluida como control positivo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con confirmación mediante digestión de restricción con BamHI (análisis RFLP, Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción). Los resultados mostraron la presencia del gen fimH en el 80% de los aislados clínicos evaluados (8/10) y su ausencia en las dos cepas restantes (Kp1 y Kp7). En conclusión, se identificó una alta frecuencia del gen fimH en los aislados clínicos analizadas, lo que proporciona un avance molecular para el inicio de la caracterización integral de los factores de virulencia en esta bacteria de importancia crítica a nivel global.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*, fimH, Virulencia bacteriana

ABSTRACT

In 2024, the World Health Organization (WHO) published its list of priority bacterial pathogens for public health, ranking *Klebsiella pneumoniae* first in the critical-priority category due to its antimicrobial resistance. This classification reflects the increasing detection of carbapenem-resistant isolates associated with in-hospital mortality rates exceeding 30%, together with the presence of multiple virulence genes encoded on both chromosomal and plasmid DNA. In this context, our research group initiated the study of several genes associated with virulence and antimicrobial resistance. The aim of the present study was to detect the gene encoding the FimH adhesin, a component of type 1 fimbriae implicated in biofilm formation, in clinical isolates of *K. pneumoniae*. Ten clinical isolates (Kp1–Kp10) and the reference strain ATCC 13883 (used as a positive control) were analysed by polymerase chain reaction (PCR), with confirmation by BamHI restriction digestion (restriction fragment length polymorphism, RFLP, analysis). The results showed the presence of the fimH gene in 80% of the clinical isolates (8/10) and its absence in two isolates (Kp1 and Kp7). In conclusion, a high frequency of the fimH gene was identified among the evaluated clinical isolates, providing a molecular basis for the broader characterisation of virulence factors in this bacterium of global public health concern.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, fimH, Bacterial virulence

*Autor de correspondencia: Héctor Samuel López Moreno

Email: hslmoreno@ms.uas.edu.mx

ORCID ID: [0000-0001-7391-205X](https://orcid.org/0000-0001-7391-205X)

Registro ORCID Autores: VC: [0009-0006-1796-8845](https://orcid.org/0009-0006-1796-8845); GC: [0009-0008-9222-8171](https://orcid.org/0009-0008-9222-8171); HS: [0009-0002-9578-9464](https://orcid.org/0009-0002-9578-9464);

BL: [0000-0002-8604-2847](https://orcid.org/0000-0002-8604-2847); SS: [0009-0005-0869-4777](https://orcid.org/0009-0005-0869-4777);

Revista online: <https://revistas.uas.edu.mx/index.php/QBU/index>

INTRODUCCIÓN

El género *Klebsiella* comprende bacilos Gram-negativos, encapsulados, no móviles y anaerobios facultativos, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae (Asokan et al., 2025; Huang et al., 2025). En los seres humanos, *Klebsiella* puede comportarse como comensal del tracto gastrointestinal, cavidad bucal y la nasofaringe, aunque bajo determinadas condiciones se convierte en un patógeno oportunista causante de infecciones sistémicas y localizadas (Asokan et al., 2025; Huang et al., 2025; Zhu et al., 2021). *Klebsiella pneumoniae* es la especie clínicamente más relevante del género, debido a su capacidad para causar infecciones adquiridas en la comunidad y nosocomiales, incluyendo abscesos hepáticos, neumonía, endoftalmitis, meningitis, infecciones urinarias y bacteriemia (Asokan et al., 2025; Bengoechea & Sa Pessoa, 2019; Gołębiewska et al., 2019; Huang et al., 2025). La susceptibilidad a las infecciones por *K. pneumoniae* es multifactorial, resultante de la interacción entre factores del hospedero (edad, estado inmunitario y comorbilidades), factores ambientales (exposición a antibióticos, condiciones hospitalarias) y factores del propio microorganismo, entre las que destacan mecanismos de virulencia y resistencia antimicrobiana (Asokan et al., 2025; Huang et al., 2025; Schembri et al., 2005; Zhu et al., 2021).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a *K. pneumoniae* entre las bacterias de prioridad crítica debido a la frecuente identificación de aislados resistentes a carbapenémicos como imipenem y ertapenem y a otros antimicrobianos de última línea como cefepima. En México, esta bacteria se encuentra entre los principales agentes etiológicos de infecciones hospitalarias multiresistentes, asociándose con una elevada morbilidad, mortalidad y costos sanitarios (Calderon-Gonzalez et al., 2023). El surgimiento de cepas hipervirulentas y multiresistentes, que combinan altos niveles de factores de virulencia con resistencia antimicrobiana amplia, complica el tratamiento y aumenta el riesgo de brotes nosocomiales (Asokan et al., 2025; J. Chen et al., 2023; Huang et al., 2025; Zhu et al., 2021). *Klebsiella pneumoniae* evade la respuesta inmune mediante varios mecanismos: producción de cápsula, modulación de la respuesta inflamatoria y formación de biopelículas, lo que favorece su persistencia y diseminación en entornos clínicos (Chang et al., 2021; Wang et al., 2020). Estas estrategias incrementan la capacidad de colonización y la resistencia a la eliminación por el hospedero (Asokan et al., 2025; T. Chen et al., 2020; Li et al., 2024; Martin & Bachman, 2018).

Los factores de virulencia de *Klebsiella pneumoniae* incluyen la cápsula polisacárida, lipopolisacáridos (LPS), fimbrias (tipo 1 y tipo 3), sideróforos y plásmidos portadores de genes de virulencia; estas estructuras participan en la evasión inmune, la persistencia, adhesión y adquisición de nutrientes, y están asociadas con y la patogenidad en el hospedero (T. Chen et al., 2020; Li et al., 2024). En específico, las fimbrias facilitan la fijación a superficies epiteliales del hospedero y a la formación de biopelículas, procesos críticos para el establecimiento de infecciones, o bien para su permanencia en las superficies de dispositivos médicos (Asokan et al., 2025; Huang et al., 2025; Schembri et al., 2005; Zhu et al., 2021).

El operón de la fimbrias tipo 1 incluye genes funcionales como fimA (subunidad mayor), fimF/fimG (subunidades accesorias), y genes de ensamblaje y regulación (fimC, fimD, fimI, fimK) (Schembri et al., 2000; Stahlhut et al., 2009). Entre ellos, fimH codifica la adhesina de tipo lectina FimH, que reconoce residuos de manosa en glicoproteínas del hospedero y promueve la adhesión, la colonización y la formación de biopelículas; estos procesos son particularmente relevantes en infecciones del tracto urinario y en la persistencia en superficies bióticas y no-bióticas (Sarshar et al., 2020; Schembri et al., 2000; Stahlhut et al., 2009). Sustituciones en la secuencia de fimH pueden alterar la afinidad por manosa, la densidad y morfología fimbrial, y por tanto modular la adhesión, el tropismo y la virulencia. Por ello, el análisis genético de fimH contribuye a explicar diferencias de patogenidad entre aislados clínicos y ambientales (Lopatto et al., 2024a; Sarshar et al., 2020; Schembri et al., 2000; Stahlhut et al., 2009).

La caracterización molecular mediante PCR y posterior análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos tras digestión con enzimas de restricción (PCR-RFLP) constituye una herramienta rápida y de bajo costo para la detección de genes como fimH y para la identificación de patrones polimórficos que facilitan la diferenciación entre aislados y el seguimiento de brotes (Chang et al., 2021; Rohit et al., 2016). No obstante, el poder de resolución de PCR-RFLP depende de la presencia de sitios de restricción discriminatorios y puede requerir confirmación por secuenciación para caracterizar mutaciones puntuales no detectables por RFLP.

La integración de datos genéticos con perfiles fenotípicos (resistencia antimicrobiana, características de virulencia) permite correlacionar genotipos con comportamiento clínico, información útil para el control y la prevención hospitalaria (Lopatto, et al., 2024b). El análisis de fimH permite profundizar en los mecanismos de adhesión e invasión que

subyacen a la persistencia de *K. pneumoniae*, y puede orientar el desarrollo de estrategias anti-adhesinas complementarias a las terapias antimicrobianas convencionales (Lopatto et al., 2024b; Sarshar et al., 2020). Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la presencia del gen fimH en aislados clínicos de *K. pneumoniae* aisladas en un entorno hospitalario, mediante análisis in silico (alineamientos, predicción de sitios de restricción) e in vitro (PCR específica seguida de confirmación por digestión enzimática RFLP).

MATERIALES Y MÉTODOS

PCR-RFLP IN SILICO DEL GEN fimH

Se utilizó la secuencia nucleotídica del gen fimH de *K. pneumoniae* (número de acceso GenBank: FJ483600.1) como referencia para el diseño de la estrategia de amplificación. Los iniciadores F-fimH (5'-TGCTGCTGGGCTGGTCGATG-3') y R-fimH (5'-GGGAGGGTGACGGTGACATC-3'), previamente descritos por Yu et al. (2006), fueron evaluados mediante el programa OligoAnalyzer (IDT, Integrated DNA Technologies) para determinar sus características fisicoquímicas. La amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) in silico se simuló con software Serial Cloner v2.6.1, y el análisis de los sitios de restricción se realizó con el software SnapGene Viewer, empleando la herramienta bioinformática Virtual Cutter para predecir patrones de digestión diferenciales con diversas enzimas de restricción (Hernández-Sánchez & López-Moreno, 2024).

EXTRACCIÓN DEL gDNA DE K. PNEUMONIAE

Se utilizaron diez aislados clínicos de *K. pneumoniae*, así como la cepa de referencia ATCC 13883 (como control positivo), las diez aislados clínicos fueron denominadas "Kp" (Kp1-Kp10); 6 fueron aisladas de urocultivo (Kp2, Kp6-Kp9), 3 de herida postoperatoria (Kp3, Kp4 y Kp5) y 1 de expectoración (Kp10), todas obtenidas de muestras de pacientes del Hospital General de Culiacán, Sinaloa, México, quienes en esa institución firmaron una carta de consentimiento informado para el uso anónimo y con fines educativos y de investigación de sus derivados biológicos, estas cepas fueron donadas a nuestro grupo de investigación por el Dr. Salvador Velarde. Las cepas Kp, se cultivaron en medio Brain Heart Infusion (BHI, BD Difco®) a 37 °C hasta alcanzar fase exponencial, siguiendo protocolos estándar, considerando un valor de 0.5 a 600 nm. Las biomásas se recuperaron por centrifugación a 10,000 × g durante 15 min y el gDNA se extrajo empleando el método estándar de Aljanabi y Martínez (1997), con ligeras modificaciones. Brevemente, las pastillas

celulares se resuspendieron en 400 µL de solución homogeneizadora (NaCl 400 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 2 mM pH 8.0), seguido de la adición de 40 µL de SDS al 20% (p/v) y 8 µL de proteinasa K (20 mg/mL). La mezcla se incubó a 60 °C durante 1 h. Posteriormente, se adicionaron 300 µL de NaCl 6 M, se mezcló vigorosamente en vórtex durante 30 s y se centrifugó a 10,000 × g durante 30 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo cónico estéril tipo Eppendorf, se precipitó el DNA con un volumen equivalente de isopropanol y se incubó a 20 °C durante 1 h. El precipitado obtenido tras centrifugación se lavó con etanol al 70% v/v, se dejó secar a 60 °C en un minitermobloque (Joanlab) y se resuspendió en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

AMPLIFICACIÓN DEL GEN fimH MEDIANTE PCR

Las amplificaciones por PCR del gen fimH con los gDNA de la cepa de referencia ATCC 13883 y los Kps, se llevaron a cabo en un termociclador MiniAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) utilizando los iniciadores F-fimH y R-fimH previamente descritos. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min; 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 1 min; seguido de una extensión final a 72 °C durante 10 min. Cada reacción se preparó en un volumen final de 25 µL, compuesto por: 8.75 µL de Máster Mix (Sigma-Aldrich), 2 µL de cada iniciador (2.5 µM), 5 µL (12 ng/µL) de gDNA como molde y 7.25 µL de agua estéril. Se incluyó un control negativo con agua en lugar de DNA molde. Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), teñido con SYBRGold (Sigma-Aldrich), aplicando un voltaje de 80 V durante 40 min, y se documentaron bajo luz UV, utilizando la cámara de 12 Mp integrada en un iPhone 11 (Apple).

ANÁLISIS RFLP DEL GEN fimH

Con base en el análisis in silico del producto amplificado por la PCR simulada, se seleccionó la enzima BamHI (Jena Biosciences) para confirmar la presencia del gen fimH mediante la observación de los patrones de restricción de tamaño molecular definido. Las digestiones enzimáticas se prepararon en un volumen final de 23 µL, conteniendo 10 µL del producto de PCR, 0.3 µL de BamHI (6 UI), 3 µL de amortiguador 10X Universal (Jena Biosciences) y agua inyectable estéril (Pisa). Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 2 h, al término de las cuales, se inactivó a la enzima, sometiéndola a una temperatura de 80 °C por 5 min, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los fragmentos

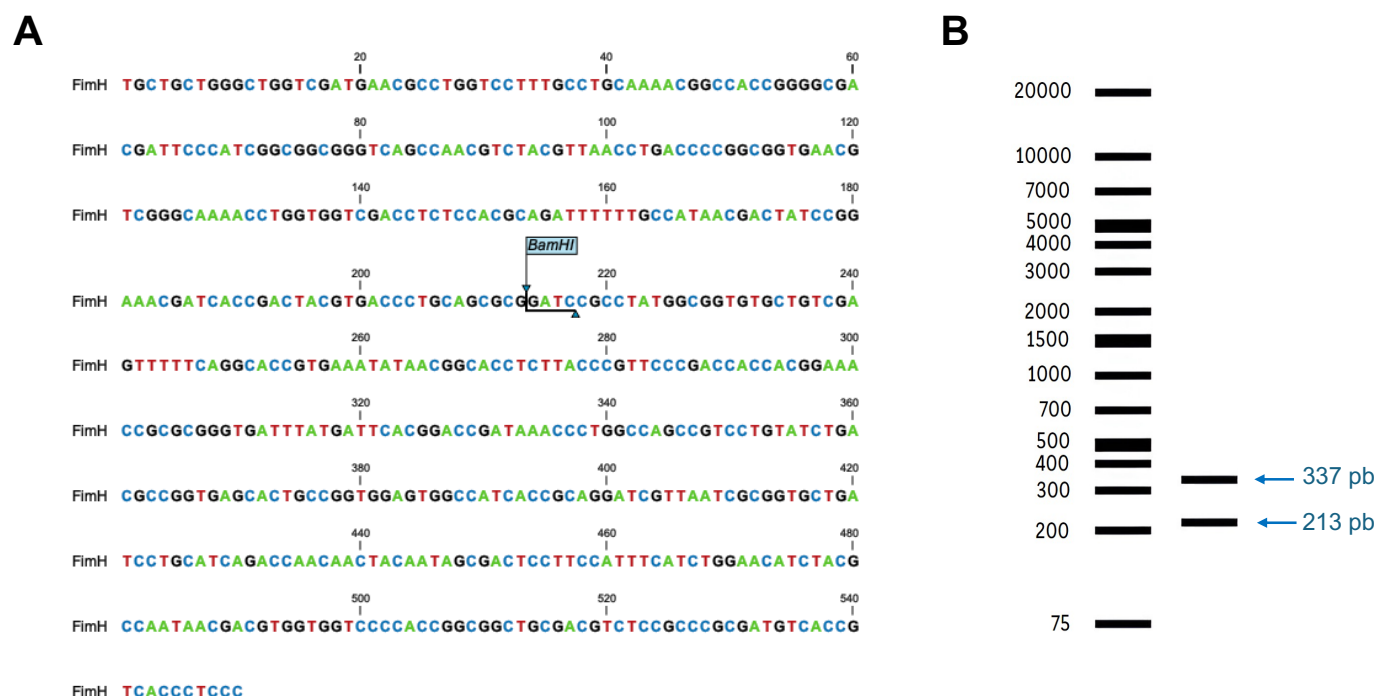


Figura 1. PCR-RFLP in silico del gen fimH de *K. pneumoniae*. En A), Secuencia del gen fimH de *K. pneumoniae* obtenida mediante una PCR simulada empleando los iniciadores específicos reportados por (Hernández-Sánchez & López-Moreno, 2024; Yu et al., 2006), donde se muestran los 550 nucleótidos que la componen, consistentes a los 550 pb esperados en un gel de agarosa. El sitio de restricción de la enzima BamHI se señala con una bandera azul en la posición 213 (Imagen obtenida con el software CLC Sequence Viewer 8). En B), Patrón de restricción simulado del gen fimH amplificado en A, digerido con la enzima BamHI. Se muestra un gel de agarosa simulado, donde se observa la longitud de dos fragmentos de restricción correspondientes a 337 y 213 pb (señalados con flechas azules) generados por el corte con la enzima BamHI sobre el producto del gen fimH obtenido en la PCR in silico.

resultantes se analizaron en geles de agarosa al 2% (p/v), teñidos con SYBRGold a una concentración 2 X diluido del vial original a 10000X (Invitrogen), empleando un marcador de tamaño molecular de 100 pb. Los perfiles de restricción se compararon con los patrones in silico reportados previamente (Hernández-Sánchez & López-Moreno, 2024).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ANÁLISIS IN SILICO DEL GEN fimH MEDIANTE PCR-RFLP

La simulación computacional de la PCR in silico constituye una estrategia preliminar fundamental para la validación del diseño experimental de técnicas de tipificación molecular (Velázquez-Escobar, 2025). En este estudio se emplearon iniciadores específicos dirigidos a regiones conservadas del gen que codifica para la adhesina FimH, proteína localizada en la punta de la fimbria tipo 1 de *K. pneumoniae*, cuya función está asociada con la adhesión dependiente de manosa a células

epiteliales y, por ende, al establecimiento de biopelículas en superficies tanto biológicas como abióticas.

Los resultados del análisis in silico indicaron la amplificación de un fragmento de aproximadamente 550 pb correspondiente a fimH (Figura 1A), en concordancia con los tamaños moleculares previamente reportados para esta diana molecular en aislados clínicos y ambientales de *K. pneumoniae* (Swedan & Aldakhily, 2024; Yu et al., 2006). En paralelo, se realizó el análisis de sitios de restricción en el fragmento amplificado mediante un panel de enzimas disponibles en bases de datos bioinformáticas (<https://nc3.neb.com/NEBcutter/>; <https://www.genscript.com/tools/restriction-enzyme-map-analysis>). Al analizar el patrón de digestión de la secuencia del gen fimH, se eligió a la enzima BamHI dado que realiza un corte único dentro del producto amplificado en la PCR simulada para fimH (Figura 1A), generando dos productos de diferentes longitudes entre sí, uno de 213 pb y otro de 337

pb respectivamente, tras su digestión virtual (Figura 1B). La diferencia de longitud o tamaño entre ambos fragmentos (124 pb) resulta suficiente para garantizar una resolución adecuada mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, lo que avala su utilización como herramienta de tipificación molecular por polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción (RFLP).

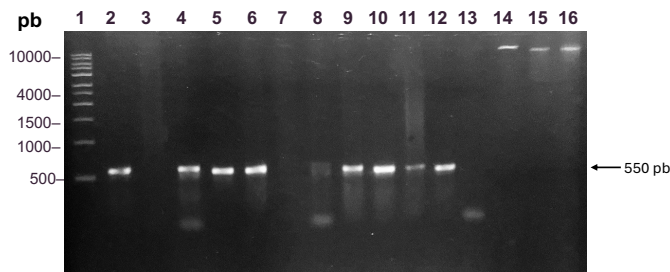


Figura 2. Presencia del gen de fimH en los aislados clínicos de *K. pneumoniae*. Ocho de las 10 muestras clínicas analizadas presentan un producto (amplicón) de 550 pb (indicado con la flecha negra) en un gel de agarosa al 2% p/v, consistente con el amplicón de la PCR in silico. La distribución de las muestras fue: 1. Marcador (Sigma-Aldrich 1 kb), 2. Kp ATCC 13884, 3. Kp1, 4. Kp3, 5. Kp4, 6. Kp5, 7. Kp7, 8. Kp8, 9. Kp9, 10. Kp10, 11. Kp2, 12. Kp6, 13. Control negativo, 14. gDNA ATCC 13884, en 15 y 16 se incluyen alícuotas equivalentes de gDNA (al de la cepa de referencia ATCC 13884) de los dos aislados clínicos que resultaron negativos a la presencia del gen fimH en la PCR, correspondientes a Kp1 (15) y Kp7 (16). Resultado representativo de 3 experimentos independientes (Yu et al., 2006).

Este enfoque resulta particularmente útil para la caracterización de genes asociados con virulencia en patógenos multirresistentes, dado que integra herramientas bioinformáticas con estrategias moleculares experimentales que permiten generar predicciones confiables antes de la ejecución de ensayos in vitro, disminuyendo costos y tiempo de optimización metodológica (Asokan et al., 2025; J. Chen et al., 2023; Lopatto et al., 2024a; Schembri et al., 2005; World Health Organization, 2024; Zhu et al., 2021). En este sentido, la integración de herramientas bioinformáticas y metodologías moleculares experimentales fortalece la caracterización de genes asociados a factores de virulencia en *K. pneumoniae*, como la adhesina de la fimbria tipo 1, analizada en este trabajo.

DETECCIÓN EXPERIMENTAL DEL GEN fimH MEDIANTE PCR

Una vez establecida la validez computacional, la PCR se implementó experimentalmente en un total de 10 aislados clínicos de *K. pneumoniae* (Kp1–Kp10) aisladas de contexto hospitalario, además se incluyó a la cepa de referencia ATCC 13883 como control positivo, para mayor certidumbre en nuestros análisis. Los resultados confirmaron la

amplificación exitosa del fragmento de 550 pb en 8 de las 10 cepas Kp evaluadas, lo que representa una prevalencia de 80% del gen fimH en la colección microbiana evaluada (Figura 2). En contraste, Kp1 y Kp7 se identificaron como negativas para la presencia de este determinante genético, lo cual refleja un porcentaje minoritario (20%) de aislados potencialmente portadores de variantes no fimbriales de adhesión o mecanismos alternativos de colonización (Gerlach et al., 1989; Lopatto et al., 2024a; Pourmohammad-Hosseini et al., 2023; Sarshar et al., 2020; Stahlhut et al., 2009; World Health Organization, 2024). Estos hallazgos concuerdan con estudios recientes que resaltan la alta frecuencia de fimH en aislados clínicos. Swedan & Aldakhily (2024) reportaron una prevalencia del 88.6% en aislados de *K. pneumoniae* provenientes de hospitales en Jordania, incluso dentro de subpoblaciones con perfiles de resistencia crítica (Swedan & Aldakhily, 2024). La elevada prevalencia de este gen se explica por su participación estructural y funcional en la biología del patógeno, favoreciendo la supervivencia bacteriana frente al aclaramiento mecánico en tejidos mucosos.

En consecuencia, fimH se ha consolidado como un biomarcador molecular robusto, cuya detección permite la identificación de cepas potencialmente virulentas en estudios de vigilancia epidemiológica y diagnóstico temprano, particularmente en regiones geográficas con alta carga de infecciones asociadas a la atención en salud (Lopatto et al., 2024a; Pourmohammad-Hosseini et al., 2023; Schembri et al., 2000, 2005; Swedan & Aldakhily, 2024). La presencia predominante del gen en las cepas locales analizadas en este trabajo ofrece indicios sobre patrones conservados de virulencia en nuestra área de estudio y refuerza

la necesidad de implementar análisis rutinarios de este biomarcador en los hospitales del país.

ANÁLISIS EXPERIMENTAL DEL GEN fimH

Los productos obtenidos in vitro mediante la PCR correspondientes al gen fimH fueron digeridos con la enzima BamHI seleccionada del análisis in silico, obteniéndose en 7 de los aislados clínicos positivos un patrón de restricción consistente de dos fragmentos (213 y 337 pb) resultantes de la digestión enzimática simulada empleando la misma enzima (Figura 3). Dicho patrón fue uniforme tanto para la cepa de referencia de *K. pneumoniae* ATCC 13883, así como para como todos los aislados clínicos que resultaron positivos (Kp2, Kp3, Kp4, Kp5, Kp6, Kp9 y Kp10), inesperadamente la cepa Kp8 presentó un patrón ligeramente diferente con la banda de 213 pb y una de unos 150 pb probablemente debido a un polimorfismo de fimH en esta cepa clínica, que podría poseer más de un

sitio para BamHI que deberá verificarse por secuenciación. La ausencia de variaciones en el patrón de fragmentación indica que el gen fimH presenta un alto grado de conservación genética en las cepas evaluadas, sin polimorfismos detectables por esta técnica. Se observaron diferencias en la intensidad de bandas entre las cepas (ej. mayor intensidad en Kp3, Kp8 y Kp9 respecto a Kp2, Kp6 y Kp10), lo que probablemente se deba a variaciones en la concentración inicial de gDNA o en la eficiencia de la amplificación posiblemente inherente a la variación entre cepas, sin afectar la interpretación de los patrones de restricción en general. Estos resultados coinciden con estudios recientes que destacan la prevalencia y conservación de fimH en *K. pneumoniae*, como lo publicado por Pourmohammad-Hosseini et al. (2023), quienes reportaron una prevalencia del 95% del gen fimH detectado en cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos, asociando a fimH con la colonización de tracto urinario y respiratorio (Pourmohammad-Hosseini et al., 2023). Asimismo, se ha observado una correlación entre fimH, la capacidad de formación de biofilms y fenotipos multirresistentes (Li et al., 2024). Estas evidencias apoyan la relevancia de fimH como biomarcador de virulencia y como factor implicado en la persistencia hospitalaria de *K. pneumoniae*.

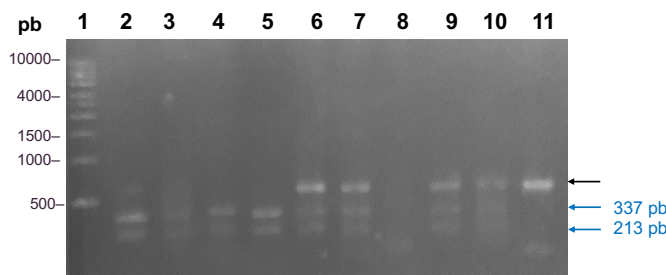


Figura 3. RFLP del gen fimH en aislados clínicos de *K. pneumoniae* mediante digestión con BamHI. Patrón de restricción in vitro del gen fimH tratado con la enzima BamHI correspondientes a los amplicones de PCR de cada una de los aislados clínicos de *K. pneumoniae* analizadas in vitro, consistentes con la PCR-RFLP simulada (in silico) de la figura 1, visualizado en un gel de agarosa al 2%, teñido con SYBRGold (Sigma-Aldrich), donde se observa la longitud de dos fragmentos de restricción (RFLP) correspondientes a 337 y 213 pb (señalados con flechas azules). En 1. Marcador molecular 1 kb (Sigma-Aldrich), 2. Kp ATCC 13883, 3. Kp2, 4. Kp3, 5. Kp4, 6. Kp5, 7. Kp6, 8. Kp8, 9. Kp9, 10. Kp10, 11. Control negativo (producto de PCR de fimH Kp ATCC 13883 sin enzima de digestión, flecha negra). Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

Estudios genómicos a gran escala también muestran la diversidad estructural del gen, Lopatto et al. (2024a) reportaron que >70% de los genomas analizados compartían un alelo idéntico de fimH, mientras que

variantes específicas exhibían mayor afinidad de unión a manosa, favoreciendo la colonización en contextos clínicos como infecciones asociadas a catéteres (Lopatto et al., 2024a). Para verificar si esos hallazgos mediados por FimH se desarrollan en nuestras cepas Kp en estudio y analizar la posible virulencia diferencial entre ellas, se requieren evaluaciones de estructura y función, iniciando con su participación en la adherencia e invasión in vitro e in vivo.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo confirman que fimH es un gen altamente prevalente (80%) y conservado entre aislados clínicos locales, con patrones de restricción homogéneos que concuerdan con la predicción in silico. Esta aproximación metodológica demuestra que la combinación de PCR y RFLP constituye una herramienta accesible y confiable para la caracterización molecular de fimH. Futuras investigaciones que integren un mayor número de aislados clínicos y análisis de expresión génica permitirán profundizar en la participación de este gen y de otros, en la adhesión, la resistencia antimicrobiana y la hipervirulencia de *K. pneumoniae*.

CONCLUSIONES

El abordaje combinado de análisis in silico y PCR-RFLP experimental empleando la enzima de restricción BamHI permitió detectar el gen fimH en 8 de 10 aislados clínicos (80%) y en la cepa de referencia *K. pneumoniae* ATCC 13883. La digestión con BamHI generó patrones de restricción concordantes in silico e in vitro (fragmentos ~213 y ~337 pb), lo que respalda la idoneidad de la estrategia PCR-RFLP para la detección y caracterización preliminar de fimH en colecciones clínicas. No obstante, la uniformidad del patrón de RFLP observado únicamente indica conservación de los sitios de restricción evaluados y no excluye la presencia de variaciones nucleotídicas fuera de dichos sitios, ni de mutaciones sin efecto sobre el reconocimiento de BamHI. Por tanto, si bien los resultados sugieren un alto grado de conservación del locus fimH entre los aislados clínicos analizadas, esta conclusión debe interpretarse con cautela dado el tamaño de la muestra. Por su sencillez y bajo costo, la PCR-RFLP con BamHI constituye una herramienta útil como cribado inicial y apoyo en estudios epidemiológicos de *K. pneumoniae*, especialmente en contextos con recursos limitados. Sin embargo, para una caracterización exhaustiva y para la identificación de variantes alélicas con posible repercusión funcional o epidemiológica se recomienda complementar el análisis con (i) secuenciación directa de amplicones representativos, (ii) ampliación de la cohorte de aislados y (iii) estudios de correlación genotipo-fenotipo (por ejemplo, perfiles de

resistencia antimicrobiana, pruebas de formación de biofilm y análisis de expresión génica). Estas acciones permitirán validar la aplicabilidad de fimH como marcador de vigilancia y clarificar su relación con fenómenos de hipervirulencia y multirresistencia.

AGRADECIMIENTOS

Los Autores agradecen al Dr. Salvador Velarde por el donativo de los aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*.

APROBACIÓN DE COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA

El proyecto DCB 2023-7: Caracterización inmunobiotecnológica de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* con selección de antígenos para su expresión recombinante del cual derivó este trabajo fue avalado por el H. Comité de Investigación y Ética del Posgrado en Ciencias Biomédicas, UAS.

FINANCIAMIENTO

Este proyecto fue financiado con recursos propios del Laboratorio de Biomedicina Molecular de La Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, CP. 80010, Sinaloa, México.

REFERENCIAS

- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 25, Issue 22). Oxford University Press. <http://doi: 10.1093/nar/25.22.4692>
- Asokan, S., Jacob, T., Jacob, J., AlSosowaa, A. A., Cherian, T., Peijnenburg, W. J. G. M., & Vijayan, S. (2025). *Klebsiella pneumoniae*: A growing threat in the era of antimicrobial resistance. In *Microbe (Netherlands)* (Vol. 7). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100333>
- Bengoechea, J. A., & Sa Pessoa, J. (2019). *Klebsiella pneumoniae* infection biology: Living to counteract host defences. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 43, Issue 2, pp. 123–144). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy043>
- Calderon-Gonzalez, R., Lee, A., Lopez-Campos, G., Hancock, S. J., Sa-Pessoa, J., Dumigan, A., McMullan, R., Campbell, E. L., & Bengoechea, J. A. (2023). Modelling the Gastrointestinal Carriage

- of *Klebsiella pneumoniae* Infections. *MBio*, 14(1). <https://doi.org/10.1128/mbio.03121-22>
- Chen, T., Dong, G., Zhang, S., Zhang, X., Zhao, Y., Cao, J., Zhou, T., & Wu, Q. (2020). Effects of iron on the growth, biofilm formation and virulence of *Klebsiella pneumoniae* causing liver abscess. *BMC Microbiology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01727-5>
- Chen, J., Zhang, H., & Liao, X. (2023). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 16, pp. 5243–5249). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IDR.S418523>
- Gerlach, G.-F., Clegg, S., & Allen, B. L. (1989). Identification and Characterization of the Genes Encoding the Type 3 and Type 1 Fimbrial Adhesins of *Klebsiella pneumoniae*. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 171, Issue 3). <http://doi:10.1128/jb.171.3.1262-1270.1989>
- Gołębiewska, J. E., Krawczyk, B., Wysocka, M., Ewiak, A., Komarnicka, J., Bronk, M., Rutkowski, B., & Dębska-Ślizień, A. (2019). Host and pathogen factors in *Klebsiella pneumoniae* upper urinary tract infections in renal transplant patients. *Journal of Medical Microbiology*, 68(3), 382–394. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000942>
- Hernández-Sánchez, N., & López-Moreno, H. S. (2024). Estandarización de la técnica de PCR-RFLP del gen de virulencia fimH en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* [Tesis Licenciatura en Biotecnología Genómica]. Facultad de Ciencias Químico Biológicas, UAS.
- Huang, X., Yao, X., Hou, Y., Zhang, D., Xie, R., Shi, C., Shang, Y., Bi, H., Song, W., Hua, L., Li, C., Chen, H., Wu, B., & Peng, Z. (2025). Global trends of antimicrobial resistance and virulence of *Klebsiella pneumoniae* from different host sources. *Communications Medicine*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s43856-025-01112-1>
- Li, L., Gao, X., Li, M., Liu, Y., Ma, J., Wang, X., Yu, Z., Cheng, W., Zhang, W., Sun, H., Song, X., & Wang, Z. (2024). Relationship between biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* and updates on antibiofilm therapeutic strategies. In *Frontiers in*

- Cellular and Infection Microbiology (Vol. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1324895>
- Lopatto, E. D. B., Pinkner, J. S., Sanick, D. A., Potter, R. F., Liu, L. X., Villicaña, J. B., Tamadonfar, K. O., Ye, Y., Zimmerman, M. I., Gualberto, N. C., Dodson, K. W., Janetka, J. W., Hunstad, D. A., & Hultgren, S. J. (2024a). Conformational ensembles in *Klebsiella pneumoniae* FimH impact uropathogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 121(39). <https://doi.org/10.1073/pnas.2409655121>
- Lopatto, E. D. B., Santiago-Borges, J. M., Sanick, D. A., Malladi, S. K., Azimzadeh, P. N., Timm, M. W., Fox, I. F., Schmitz, A. J., Turner, J. S., Ahmed, S. S., Ortinu, L., Gualberto, N. C., Pinkner, J. S., Dodson, K. W., Ellebedy, A. H., Kau, A. L., & Hultgren, S. J. (2024b). Monoclonal antibodies targeting the FimH adhesin protect against uropathogenic *E. coli* UTI. <https://doi.org/10.1101/2024.12.10.627638>
- Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. In Frontiers in Cellular and Infection Microbiology (Vol. 8, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>
- Pourmohammad-Hosseini, G., Ghandehari, F., & Hoveida, L. (2023). The abundance of capsule (wabG) and fimbria (fimH) coding genes in multidrug-resistant (MDR) *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients admitted to Isfahan hospitals. Microbiology, Metabolites and Biotechnology, 6, 27–34. <https://doi.org/10.22104/MMB.2023.6333.1111>
- Sarshar, M., Behzadi, P., Ambrosi, C., Zagaglia, C., Palamara, A. T., & Scribano, D. (2020). FimH and anti-adhesive therapeutics: A disarming strategy against uropathogens. In Antibiotics (Vol. 9, Issue 7, pp. 1–16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070397>
- Schembri, M. A., Blom, J., Krogfelt, K. A., & Klemm, P. (2005). Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. Infection and Immunity, 73(8), 4626–4633. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4626-4633.2005>
- Schembri, M. A., Hasman, H., & Klemm, P. (2000). Expression and purification of the mannose recognition domain of the FimH adhesin. FEMS Microbiology Letters, 188(2), 147–151. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09186.x>
- Stahlhut, S. G., Chattopadhyay, S., Struve, C., Weissman, S. J., Aprikian, P., Libby, S. J., Fang, F. C., Krogfelt, K. A., & Sokurenko, E. V. (2009). Population variability of the FimH type 1 fimbrial adhesin in *Klebsiella pneumoniae*. Journal of Bacteriology, 191(6), 1941–1950. <https://doi.org/10.1128/JB.00601-08>
- Swedan, S. F., & Aldakhily, D. B. (2024). Antimicrobial resistance, biofilm formation, and molecular detection of efflux pump and biofilm genes among *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Northern Jordan. Heliyon, 10(14). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e34370>
- Velázquez-Escobar, F. M., B.-L. E., V.-C. U., L.-M. H. S. (2025). In silico design of a DNA vaccine against *Toxoplasma gondii* based on ROP35 antigen epitopes specific for murine B and CD4 + T lymphocytes. In Revista de Ciencias QuímicoQuímico BiológicasBiológicas.
- Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. In International Journal of Environmental Research and Public Health (Vol. 17, Issue 17, pp. 1–17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>
- World Health Organization. (2024). WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo>
- Yu, W. L., Ko, W. C., Cheng, K. C., Lee, H. C., Ke, D. S., Lee, C. C., Fung, C. P., & Chuang, Y. C. (2006). Association between *rmpA* and *mgaA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. Clinical Infectious Diseases, 42(10), 1351–1358. <https://doi.org/10.1086/503420>
- Zhu, J., Wang, T., Chen, L., & Du, H. (2021). Virulence Factors in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. In Frontiers in Microbiology (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.642484>